UNIVERSITA' DI PISA
Istituto di Patologia Vegetale e di Microbiologia Agraria e Tecnica
OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

441

A. Rambelli e O. Verona

Sulla utilizzazione microbica dell' acido itaconico

N
RA
MM

Estratto da *Annali di Microbiologia ed Enzimologia*, vol. XI, 1961

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
15 NOV 1962

ANNALI DI MICROBIOLOGIA ED ENZIMOLOGIA

MEMORIE DI MICROBIOLOGIA GENERALE ED APPLICATA ALLA AGRICOLTURA, ALLE INDUSTRIE FERMENTATIVE ED ALIMENTARI; DI ENZIMOLOGIA E CHIMICA DELLE FERMENTAZIONI NEI LORO RAPPORTI CON LA MICROBIOLOGIA E LA BATTERIOLOGIA INDUSTRIALE

A CURA DEI PROFESSORI

C. ANTONIANI, Milano - T. CASTELLI, Perugia - C. COLLA, Milano
G. DE ROSSI, Perugia - V. PEGLION, Bologna - B. PEYRONEL, Torino
I. POLITI, Milano - S. RICCARDO, Napoli - M. SACCHETTI, Bologna
G. TECCE, Roma - O. VERONA, Pisa - V. ZAMBOTTI, Pavia

DIRETTA DA
C. ARNAUDI Milano

A. Rambelli e O. Verona

Sulla utilizzazione microbica dell'acido itaconico

(Estratto dal Fascicolo I-IV - Volume XI - 1961)

Segretario di Redazione
V. TRECCANI

Direzione e Amministrazione: VIA CELORIA, 2
MILANO

ANN. MICR.

Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica dell'Università di Pisa

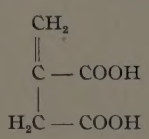
Direttore: Prof. O. Verona

Sulla utilizzazione microbica dell'acido itaconico

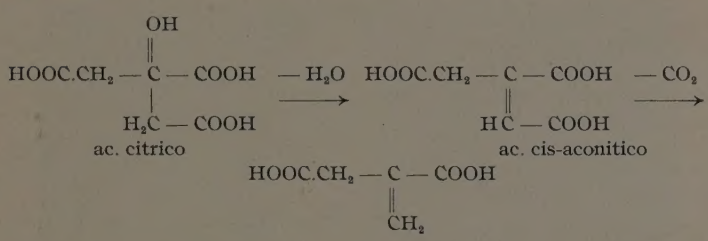
A. Rambelli (*) e O. Verona

L'acido itaconico fu per la prima volta evidenziato da Kinoshita (1929) tra i prodotti del metabolismo di un Aspergillo denominato *Asp. itaconicus* Kin. Successivamente fu visto che tale proprietà è comune anche ad *Asp. terreus* Thom.

Trattasi di un acido bicarbossilico non saturo che risponde alla formula:



e che deriverebbe, secondo lo stesso Kinoshita, dall'acido citrico via acido cis-aconitico (**):



Tale processo fermentativo a base ossidativa è ormai ben studiato in tutti i suoi fondamentali aspetti sia teorici che applicativi.

Non è quindi su di esso che si è fermata la nostra attenzione. All'opposto si è voluto saggiare fino a che punto era possibile la sua utilizzazione microbica e comunque vedere quale comportamento avrebbero offerto, di fronte ad esso, alcune specie di microrganismi. A questo riguardo pensavamo di avere — come poi non risultò — una risposta più o meno negativa in quanto gli acidi bicarbossilici non saturi presentano notoriamente — specie se in forma *trans* — una certa attività germicida.

(*) Della Sezione di Microbiologia del Centro di Sperimentazione Agricola e Forestale dell'Ente Nazionale Cellulosa e Carta.

(**) Così, anche secondo più recenti indagini di Larsen e Eimhjellen (1) e Eimhjellen e Larsen (2).

Per Bentley e Thiessen (3), *Asp. terreus* produce una cis-aconitico-decarbossilasi avente specifica azione sulla forma *cis* dell'ac. aconitico e non sulla forma *trans*. È questa, forse, la prima descrizione di un enzima capace di decarbossilare un acido α, β-non saturo.

RISULTATI SPERIMENTALI

I - *L'utilizzazione dell'acido itaconico da parte di Schizomiceti.*

Rilievi su colture brute. — Ad una soluzione minerale costituita da:

NH_4NO_3	1
KH_2PO_4)	0.005 mole, totale per pH 7.6
K_2HPO_4)	
$MgSO_4$	0.25
NaCl	0.10
$CaCl_2$	0.05
$FeCl_3$	0.001
Zn	tr.
Mn	tr.
acqua	1000

furono aggiunte poche gocce di estratto di lievito e acido itaconico in ragione di g 0,5.

Tale mezzo, distribuito in matracci conici, fu inoculato con poche gocce di liquido di decantazione proveniente da una sospensione in acqua di liquido cloacale: a controllo matracci non inoculati.

Colture in aerobiosi, statiche, a 27° C.

Dopo dodici giorni fu osservato che il liquido dei matracci di controllo rimaneva limpido; nei matracci inoculati fu osservata invece una relativa torbidità e sviluppo in seno al liquido di ciuffi micelici. Gli esami batterioscopici indicarono che tale torbidità, indipendentemente dalla presenza di miceli fungini, era dovuta a presenza di forme batteriche. Il pH del liquido scese da 7.6 a 6.8.

Con materiale proveniente da queste colture furono di nuovo inoculati altri matracci contenenti uguale liquido colturale presente ac. itaconico 0.5°/oo.

Come in precedenza al 10° giorno circa fu notato intorbidamento sensibile. Il pH del liquido scese da 7.2 a 6.4; al controllo chimico l'*acido itaconico risultò consumato* (*). Esami batterioscopici svelarono presenza di forme bastoncellari.

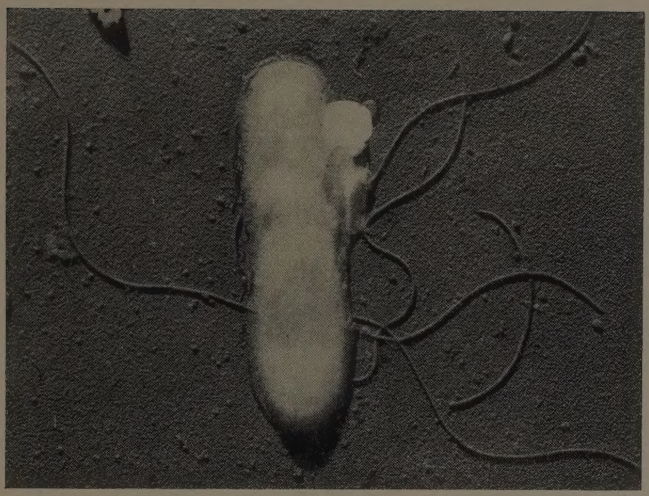
I risultati tratti da queste colture brute stanno dunque ad indicare la possibile utilizzazione microbica dell'acido itaconico. Il notato sviluppo doveva infatti considerarsi legato alla presenza del composto, in quanto assenti nel mezzo colturale altre sorgenti di carbonio; d'altronde lo stesso composto non risultò, a termine della coltura, chimicamente svelabile.

Isolamento di colture pure. — Con il materiale di cui alle precedenti colture furono allestite piastre con il substrato sintetico agarizzato e con agar nutritivo. Incubazione a 26° C.

Nel substrato sintetico agarizzato lo sviluppo, anche trascorso del tempo, apparì appena avvertibile. In agar-nutritivo si manifestò invece più evidente; ma anche in tal caso fu sviluppo relativamente lento di colo-

---

(*) Per la ricerca e il dosaggio dell'acido itaconico fu seguito il metodo di Friedkin (4).



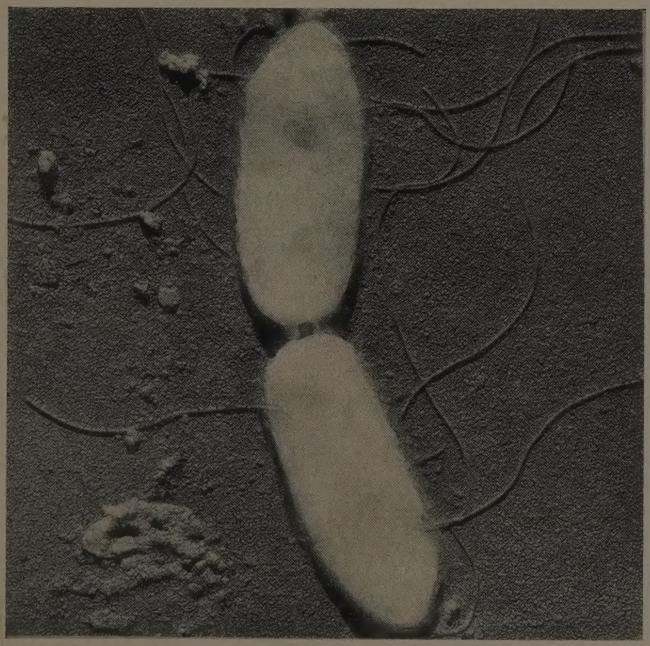


Fig. 1. – Fotomicrografia degli isolati di *Alcaligenes faecalis* attivi su acido itaconico

nie piccole, non più grandi di mm. 1.6-2. A leggero ingrandimento tali colonie apparirono rotonde, rilevate, a bordo continuo, sub-ialine.

Eseguiti diversi isolamenti tutti dimostrarono far capo ad una forma batterica rispondente ai seguenti caratteri:

« Bastoncini rigidi di μ (0.4-0.6) $\times$ (0.8-1.4), raramente più lunghi, isolati, abbinati o molto raramente in corta catena. In alcuni mezzi si presentano leggermente capsulati. Sono mobili peritrichi, non sporulanti, gram-negativi, non acido-resistenti.

Aerobi. In brodo nutritivo che, con il tempo, diviene leggermente vischioso, sviluppano formando denso sedimento; in soluzione di peptone 1.5% addizionata di zuccheri si ha anche formazione di leggera pellicola. In agar nutritivo, striscio di non notevole sviluppo rappresentato da patina opaca, lucente, un po' rilevata, mucosa e, talvolta, di leggerissimo colore giallo-rosato. In agar-fagioli saccarosato sviluppo limitato di patina scarsa, rasa, biancastra. Sviluppo non abbondante di patina bianco-gialliccia su patata.

Sviluppo superficiale in gelatina che non fluidifica.

Il latte rimane immodificato; leggera reazione alcalina.

Da glucosio, galattosio, saccarosio, maltosio, lattosio, nè acidi nè gas.

Negativa la reazione di Voges-Proskauer.

Non forma indolo.

Riduce i nitrati a nitriti.

Sviluppa a 37° C.»

Si tratta senza dubbio di una specie riferibile alla Famiglia delle *Achromobacteriaceae* Breed e al genere *Alcaligenes* Cast. et Chalm. Molto verosimilmente si tratta di *Alcaligenes faecalis* Cast. et Chalm. poiché i caratteri rilevati sono in buon accordo con quelli dati come propri di questa specie.

Le condizioni di isolamento lasciavano pensare che tale ceppo di *Alcaligenes faecalis* fosse capace di utilizzare l'acido itaconico. È quanto cercammo di accertare. Allestiti, inoculati e incubati a 26° C. matracci conici contenenti cc. 200 di liquido colturale prima ricordato, dopo 5-6 giorni si potè notare intorbidamento evidente. Al controllo chimico l'acido itaconico risultò diminuito di circa il 5%. A distanza di 15 giorni l'intorbidamento si fece un poco più intenso e un poco più intensa la diminuzione del composto, che così si dimostrò utilizzato, almeno in una certa misura, dal nostro isolato.

II - *L'utilizzazione dell'acido itaconico da parte di alcuni Ifomiceti.*

Come mezzo colturale fu impiegato il liquido di Czapek-Dox contenente, come sorgente di carbonio, o glucosio 20‰ o altrimenti acido itaconico 18‰. In quest'ultimo caso il pH fu portato, per aggiunte di soda, al valore di pH 6 circa. I due mezzi vennero distribuiti in ragione di cc 50 in matracci da cc. 200, sterilizzati e inoculati con una piccola serie di funghi. Prove in triplo; incubazione a 26° C.

Attraverso i dati raccolti si osserva che molte delle specie saggiate hanno dimostrato svilupparsi in presenza di acido itaconico; emergono, soprattutto, le varie specie di *Fasarium*. Tale sviluppo esige, peraltro, un lungo periodo di incubazione. A termine dello sviluppo l'acido itaconico risulta fortemente diminuito; infatti, fatta eccezione per *Asp. ustus*, si ebbero consumi oscillanti tra il 50 e il 98%.

È appena da notare che nelle colture in acido itaconico nulla di par-

TABELLA 1. – *Sviluppo di alcuni funghi in presenza di ac. itaconico. (gr. di micelio in sostanza secca)*

	Al 30° giorno		Al 60° giorno
	glucosio	ac. itaconico	ac. itaconico
Alternaria tenuis	0.1605	0.0272	m.d.
Aspergillus alliaceus	0.3083	n.sv.	n.sv.
» itaconicus	0.1131	n.sv.	n.sv.
» ustus	0.2236	0.1247	0.1425
» versicolor	0.2552	0.0787	0.1347
Fusarium concolor	0.1095	0.0792	0.3730
» lini	0.1302	0.0525	m.d.
» orthoceras	0.1322	0.0893	0.3599
» oxysporum	0.1240	0.0362	0.2863
» solani (ceppo f)	0.0996	0.0295	0.3648
» solani (ceppo t)	0.2075	0.0152	0.4173
Gliocladium roseum	0.2261	0.1619	0.3732
Gliomastix convoluta	0.2035	0.0622	0.3026
Penicillium cyclopium	0.0715	0.0564	m.d.
» frequentans	0.1705	tracce	0.1163
» implicatum	0.1628	id.	0.1144
» janthinellum	0.1694	n.sv.	n.sv.
» lilacinum	0.3530	0.0992	0.1169
Spicaria violacea	0.1876	n.sv.	n.sv.

(m.d. = mancano dati; n.sv. = non sviluppa).

TABELLA 2. – *Consumo di acido itaconico da parte di alcune specie di funghi*

	ac. itaconico presente (gr)		% di a. itaconico consumato al 60° giorno
	all'inizio	al 60° giorno	
Aspergillus ustus		0.7988	11.3
Fusarium concolor		0.0975	89.1
» orthoceras		0.0813	90.9
» oxysporum	0.9000	0.1950	78.4
» solani (ceppo f)		0.4463	50.4
» solani (ceppo t)		0.1625	81.9
Gliomastix convoluta		0.0163	98.1

(*) Nei liquidi colturali di alcune specie, d'altronde *ben sviluppate*, il metodo di Friedkin rivelò, a termine della coltura, quantità di ac. itaconico pressoché uguali a quelle inizialmente presenti. Verosimilmente si tratta di specie che durante l'utilizzazione dell'acido itaconico producono metaboliti stabili capaci, per mantenere il doppio legame, di reagire con il bromo e quindi di interferire con il dosaggio dello stesso ac. itaconico. Sulla natura di questi supposti metaboliti sono in corso separate ricerche.

ticolare fu notato, al controllo microscopico, sia a carico del micelio che delle fruttificazioni, rispetto alle colture cresciute in Czapek-Dox normale.

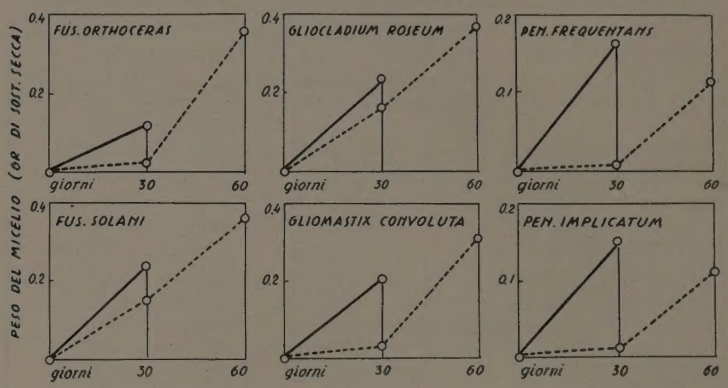


Fig. 2. – Sviluppo di alcuni funghi presente come sorgente di carbonio glucosio (—) o ac. itaconico (— — — —).

III - *Influenza dell'ac. itaconico presente nei mezzi colturali sullo sviluppo microbico.*

Come prima si è accennato acidi bicarbossilici non saturi possono esercitare azioni di freno sullo sviluppo microbico. L'acido itaconico non presenta peraltro, alla nostra esperienza, tale attività.

Saggiata, la sua eventuale azione inibente, con la tecnica dei cilindretti in uso nelle ricerche sull'antibiosi, soluzioni anche del 5‰ non hanno dato luogo a zone di inibizione nello sviluppo di *St. aureus*, *E. coli*, *Bac. subtilis*.

Analoghi risultati si sono avuti con i Funghi.

Addizionato nelle dosi dello 0.5-1-2‰ al liquido Czapek-Dox e ivi coltivata, incubando a 26° C., una piccola serie di funghi lo sviluppo avuto, secondo i dati forniti dai pesi in sostanza secca del micelio, fu il seguente:

TABELLA 3. – *Sviluppo di alcuni funghi in liquido di Czapek-Dox presente ac. itaconico. (peso del micelio in gr di sostanza secca)*

	Liq. di Czapek-Dox più ac. itaconico			
	controllo	0.5 ‰	1 ‰	2 ‰
Aspergillus terreus	0.5914	0.5700	0 5852	0.5729
Aspergillus ustus	0.5853	0.5898	0.5846	0 5554
Fusarium concolor	0.1885	0.1452	0.1463	0.1314
Fusarium lini	0.1330	0.2028	0.1575	0.1530
Pen. citrinum	0.5814	0.5686	0.6444	0.5988
Pen. frequentans	0.5179	0.4363	0.4336	0.5079
Pen. janthinellum	0.5703	0.6221	0.6178	0.5642
Pen. roseo-purpureum	0.4619	0.4660	0.4819	0.5057
Spicaria violacea	0.7244	0.6726	0.7195	0.7131
Trichothecium roseum	0.1531	0.1191	0.1460	0.2014

Nessuna azione depressiva, dunque; all'opposto e in qualche caso è registrato anzi un certo incremento di sviluppo.

CONCLUSIONI

Il bicarbossilico non saturo acido itaconico può essere demolito e quindi utilizzato come sorgente di carbonio da alcuni microrganismi.

I risultati della presente ricerca informano che, al processo demolitivo, partecipano forme batteriche essendo risultato attivo *Alcaligenes faecalis*, ma soprattutto specie di Eumiceti.

Nei riguardi di questi ultimi non tutti, tra quelli sperimentati, dimostrano manifestare pari azione. Vi sono specie, anzi, addirittura incapaci di svilupparsi in mezzi contenenti solo acido itaconico. Altre, invece, riescono ad utilizzarlo più o meno bene: tra queste emergono, sempre tra quelle sperimentate, vari *Fusarium* oltre a *Gliomastix convoluta* e *Gliocladium roseum*. In ogni caso per tale utilizzazione si rende necessario un periodo di incubazione relativamente lungo.

Il controllo delle possibili fasi demolitive esulava dallo scopo del presente lavoro. È peraltro da ammettersi che intervengano processi di decarbossilazione, di ossidazione od anche di decarbossilazione ossidativa.

Un processo demolitivo di natura ossidativa sostenuto da mitocondri è noto e recentemente illustrato da Adler e Coll. (5). Esso comporta l'intervento del coenzima-A e porta alla formazione di acido piruvico.

Ma altre vie sono possibili potendosi teoricamente avere, ad es., per via decarbossilativa od ossidativa, acido metacrilico od ac. acrilico.

Controllato se l'acido itaconico manifesta azione inibente o depressiva sullo sviluppo microbico, tali azioni non sono risultate nei riguardi delle specie sperimentate.

RIASSUNTO

Si riferisce intorno alla utilizzazione microbica dell'acido itaconico. Esso risulta demolito da una specie batterica che riteniamo identica ad *Alcaligenes faecalis*, da vari specie di *Fusarium* e altresì da altri Ifomiceti. Tale processo di demolizione esige generalmente nei ricordati microrganismi una lunga fase di latenza.

L'acido itaconico può non essere utilizzato da alcune specie microbiche: con tutto ciò esso non manifesta — sui microrganismi sperimentati — azione inibente o depressiva dello sviluppo.

SUMMARY

Is referred about the microbial utilization of itaconic acid. It results demolished by a bacterial species which we considered identical to *Alcaligenes faecalis*, by some species of *Fusarium* and other hyphomycetes.

Such process of demolition requires a long lag-phase. Itaconic acid may not be utilized by some microbial species; however it does not present any inhibiting or depressing action on the growth of the tested microrganisms.

BIBLIOGRAFIA

(1) Larsen H. e Eimhyellen K. E.: *Mechanism of itaconic acid formation by Aspergillus terreus. I. The effect of acidity*. Biochemic. J. **60**, 135, (1955).

(2) Eimhyellen K. E. e Larsen H.: *Machanisms of itaconic acid formation by Aspergillus terreus. II. The effet of substrate and inhibitors*. Biochemic. J. **60,** 139, (1911).
(3) Bentley R. e Thiessen C. P.: *Cis-aconitic decarboxylase*. Science **122,** 330, (1955).
Bentley R. e Thiessen C. P.: *Biosynthesis of itaconic acid in Aspergillus terreus*.
1). *Tracer studies with C^{14} labelled substrates*. J. of Biol. Chem., **226,** 673, (1957).
2). *Early stages in glucose dissimilation and the role of citrate*. J. of Biol. Chem., **226,** 689 (1957).
3). *The properties and reaction mechanism of cis-aconitic decarboxylase*. J. of Biol. Chem. **226,** 703, (1957).
(4) Friedkin M.: *Determination of Itaconic Acid in fermentation liquors*. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. **17,** 637, (1945).
(5) Adler J., Wang S. F. e Lardy H. A.: *The metabolism of itaconic acid by liver mitochondria*. J. Biol. Chem., **229,** 865, (1957).

Pervenuto in Redazione il 14 agosto 1961.

I. T. E. C. - G. T. - Milano